مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ۳، بهار ۱۳۸٤

تولید موش ترانس‌ژنیک واجد ترانس‌ژن بتالاکتوگلبولین- کلسی‌تونین

احمدرضا نیاورانی* (M.D)، سمیه دهقانی‌زاده (B.Sc)، محسن کریمی (M.Sc)، سیروس زینلی (Ph.D)

انستیتوپاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: بیان پروتئین‌های خارجی در شیر پستانداران یکی از راه‌کارهایی است که به تدریج کاربرد وسیعی در تولید انبوه فرآورده‌های دارویی نوترکیب می‌یابد، به‌ویژه فرآورده‌هایی که دست‌خوش بیش‌ترین تغییرات پس از ترجمه‌ای می‌شوند. هدف از این تحقیق ایجاد موش‌های ترانس‌ژنیکی بود که واجد ترانس‌ژن بیان‌کننده کلسی‌تونین هیبرید در غدد شیری موش باشند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از یک پروموتر اختصاصی شیر به نام بتالاکتوگلبولین گوسفندی (oBLG) برای القای بیان کلسی‌تونین هیبرید نوترکیب در شیر موش استفاده شد. بر این اساس، یک سازه ژنی متشکل از ۱۰/۷ کیلوباز از ژن oBLG شامل پروموتر و ناحیه پایین دست ژن ساخته شد و توالی کدکننده کلسی‌تونین در چارچوب ترجمه اگزون پنجم oBLG قرار داده شد. سازه ژنی کلون شده پس از تخلیص روی شیب سزیم کلراید، از ناقل خود آزاد شد و به وسیله ژل آگارز تخلیص گردید و با فیلتراسیون و رقیق سازی آماده استفاده شد. آن‌گاه سازه ژنی مزبور به کمک میکرومانیپولاتور در تخمک‌های تازه بارور موش تزریق شد و سلول‌های زنده مانده از این تزریقات، به لوله رحمی موش‌هایی با آبستنی کاذب بازگردانده شدند. حاصل این انتقال زیگوت‌های تزریق شده ۴۱ موش بود که ژنوتیپ آن‌ها با استفاده از PCR، اسلات بلات و ساترن بلات تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج تعیین ژنوتیپ با PCR نشان داد که ۹ موش از نظر وجود ترانس‌ژن مثبت هستند، در حالی که تنها ۴ موش بلات مثبت داشتند. ۳ موش نر و ۳ موش ماده، ترانس‌ژن را به نسل بعدی، یعنی نسل اول موش‌های ترانس‌ژنیک انتقال دادند. موش‌های نسل اول به بعد نیز ترانس‌ژن را به صورت پایا و تابع قواعد مندلی به نسل دوم انتقال دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که ۶ موش از ۹ موش مزبور توانستند ترانس‌ژن را حداقل به یکی از موش‌های نسل بعدی خویش انتقال دهند، این ۶ موش را می‌توان بانی‌های (Founders) مستقل ترانس‌ژنیک و سردسته خانواده‌های ترانس‌ژنیک مزبور در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: موش ترانس‌ژنیک، شیر، بتا لاکتوگلبولین، کلسی‌تونین، پروتئین نوترکیب، پروتئین ترکیبی

مقدمه

یکی از مهیج‌ترین چالش‌هایی که بیوتکنولوژیست‌ها با آن مواجهند، توسعه و تکامل روش‌هایی برای تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب است. پروتئین‌های نوترکیب را از دهه ۱۹۸۰ به طور انبوه در پروکاریوت‌ها بیان می‌کرده‌اند، ولی مدتی بعد به بیان برخی از آن‌ها در سلول‌های کشت یافته یوکاریوتی هم پرداختند. با این حال هیچ‌یک از روش‌های مزبور برای تولید پروتئین‌های چندزیرواحدی یا آن‌ها که دست‌خوش تغییرات زیادی می‌شوند رضایت‌بخش نبود، زیرا این گونه پروتئین‌ها پیچیده‌تر از آن هستند که بتوانند در

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۲۲۵۶۲۳۹۱، نمابر: ۰۲۱-۲۲۵۶۲۳۹۱، E-mail: a_r_nia@yahoo.com

تاریخ دریافت:۱۳۸۳/۱۱/۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۱۶

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

سیستم‌های بیانی ناکامل مزبور به درستی بیان شوند. نخستین موش‌های ترانس‌ژنیک در اوایل دهه ۱۹۸۰ تولید شدند و پس از آن بود که محققان به تدریج به فکر استفاده از رویکرد ایجاد پستانداران ترانس‌ژنیک برای بیان داروهای مختلف نوترکیب در غدد شیری آن‌ها افتادند. مزیت این روش در آن است که شیر پستانداران به میزان انبوه تولید می‌شود و آسان در دسترس است و پروتئین‌هایی که در غدد شیری بیان می‌شوند بسیار شبیه اشکال طبیعی خود هستند. این شباهت‌ها شامل ساختارهای دوم، سوم و حتی چهارم [۵،۶] و تغییرات پس‌ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون، هیدروکسیلاسیون، کربوکسیلاسیون و آمیداسیون [۹] می‌باشد. داشتن ویژگی‌های مزبور اغلب برای فعالیت زیستی این پروتئین‌ها که اکثراً بناست به عنوان فرآورده دارویی به کار روند مهم است. بیان پروتئین‌های گوناگون در غدد پستانی نه تنها امکان‌پذیر است، بلکه اقتصادی است و قابل ارتقا به مقیاس تولید انبوه نیز می‌باشد [۲،۱۲]. بنابراین از غدد شیری پستانداران می‌توان به عنوان رآکتور زیستی برای تولید پروتئین‌های پیچیده که به روش‌های دیگر قابل تولید نیستند استفاده کرد.

شیر حاوی چندین پروتئین اختصاصی است که از پروموتر آن‌ها می‌توان برای القای بیان پروتئین‌های خارجی در شیر استفاده کرد. این پروتئین‌ها عبارتند از: کازئین‌ها (αs1، αs2، β و κ) که حدود ۸۰٪ از پروتئین‌های شیر را می‌سازند و هنگام تشکیل پنیر منعقد می‌شوند و پروتئین‌های آب پنیر (بتالاکتوگلبولین، آلفالاکتالبومین و پروتئین اسیدی آب پنیر یا WAP) که ۲۰٪ باقی‌مانده را تشکیل می‌دهند. بتالاکتوگلبولین یا BLG (Beta-lactoglobulin) فراوان‌ترین پروتئین آب پنیر در شیر نشخوارکنندگان است [۱۰]. معتقدند که BLG در جابجایی اسیدهای چرب و رتینول در شیر دخالت دارد [۳،۱۱].

از پروموتر BLG گوسفندی (oBLG، ovine BLG) به کرات برای بیان پروتئین‌های خارجی در شیر پستانداران استفاده شده است [۵،۶،۹،۱۲]. گرچه BLG هیچ‌گونه مشابهی در جوندگان ندارد، ولی در موش‌ها و خرگوش‌های ترانس‌ژنیک، فاکتورهای مختلف رونویسی مخصوص غدد شیری آن را به خوبی می‌شناسند [۴،۱۶]. اگر در ساخت سازه ژنی از پروموتر oBLG برای القای بیان استفاده شود، امکان استفاده از آن سازه برای بیان پروتئین‌های مورد نظر در پستانداران اهلی از جمله بز و گوسفند به عنوان رآکتور زیستی فراهم می‌شود، زیرا آن‌ها میزبان ترجیحی برای این پروموتر می‌باشند. گرچه در اکثر گزارش‌های منتشره فقط از پروموتر BLG استفاده شده، ولی در موارد معدودی، خود ژن آن نیز برای ایجاد پروتئین ترکیبی به کار رفته است. مزایای بالقوه بیان ترکیبی به کمک oBLG عبارتند از: اثرات احتمالی افزاینده ناشی از وجود اینترون‌های oBLG، پیش‌گیری از نشت احتمالی یا رونویسی نابجا و پایدارسازی پلی‌پپتیدهای کوتاه بیان شده در محیط شیر.

اگرچه برای بیان پروتئین‌های خارجی تحت پروموترهای اختصاصی غدد شیری هم می‌توان از توالی‌های ژنومی و هم از cDNA استفاده کرد، ولی معمولاً توالی‌های ژنومی به میزان چند صد برابر cDNA بیان می‌شوند، یعنی در حد mg/ml به جای ng-µg/ml. البته معلوم نیست که آیا با افزودن توالی‌های اینترونی حاصل از یک ژن ترکیبی دیگر، می‌توان فقدان توالی‌های اینترونی در cDNA را کاملاً جبران کرد یا نه. در یکی از تحقیقات انجام شده، cDNA اریتروپویتین انسانی (hEPO) را در چارچوب ترجمه اگزون پنجم BLG گاوی وارد کردند، که حاصل آن بیان به نسبت بالای (0.5mg/ml) پروتئین ترکیبی bBLG-hEPO در شیر موش‌های ترانس‌ژنیک تولیدی بود. این در حالی بود که موش‌های ترانس‌ژنیک به علت نشت رونویسی و یا نشت پروتئین از شیر به گردش خون عمومی، دچار پلی‌سیتمی شدید شده بودند [۷].

اگرچه حتی ۴۰۶ باز پروگزیمال پروموتر نیز قادر به القای بیان ترانس‌ژن در غدد شیری موش با الگوی تکاملی مناسب است، ولی استفاده از ۴/۳ کیلو باز پروگزیمال ناحیه پروموتری، امکان بیان در سطوحی بسیار بالاتر را فراهم می‌سازد [۱۶]. قطعه ۴/۳ کیلوبازی پروگزیمال oBLG هم

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

حاوی عناصر لازم برای بیان زیاد و اختصاصی ترانس‌ژن در غدد شیری است و هم حاوی عناصری که بیان ترانس‌ژن را از اثرات محل ورود ترانس‌ژن در ژنوم حفظ می‌کنند [۱۶]. قطعه ۱/۹ کیلوبازی پایین دست ژن، حاوی ناحیه اتصال به بستر (Matrix attachment region; MAR) است [۱۵]، که نقش مهمی در جلوگیری از اثرات ژنوم موضعی دارد. در ضمن توالی‌های اینترونی هم تأثیر شگرفی بر بیان ترانس‌ژن دارند [۱۴].

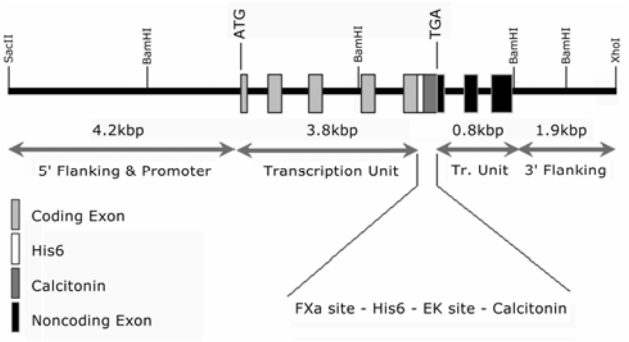
کلسی‌تونین یک پلی‌پپتید تک‌رشته‌ای ۳۲ اسیدآمینه‌ای در گردش خون است که از سلول‌های کنار فولیکولی C در تیرویید پستانداران ترشح می‌شود و در هومئوستاز اسکلتی نقش دارد [۱]. کلسی‌تونین انسانی (hCT) توان فارماکولوژیک کمی در نشاندن استئوبلاستی کلسیم در انسان دارد، در حالی که مشابه آن در ماهی آزاد (sCT) از جمله قوی‌ترین اشکال فارماکولوژیک این هورمون استخوان‌ساز است و کاربرد وسیعی در درمان استئوپورز (مثلاً استئوپورز یائسگی)، بیماری پاژه و شوک هیپرکلسمیک دارد. ویژگی‌های ساختمانی مشترکی بین کلسی‌تونین جانداران مختلف وجود دارد، از جمله حلقه سر N که بر اثر پیوند دی‌سولفیدی بین Cys1 و Cys7 ایجاد می‌شود و یک گروه آمید سر C که از یک جزء اسیدآمینه Gly اضافی در سر C ساخته می‌شود [۹].

اگرچه کلسی‌تونین ماهی آزاد (salmon CT; sCT) در انسان به اندازه کافی قوی است، ولی مصرف خوراکی آن باعث مشکلات گوارشی و ازدیاد حساسیت ایمنی می‌شود و همین موضوع، کاربرد درمانی وسیع آن را با محدودیت مواجه می‌سازد. پیش‌تر نشان داده شده است که نوعی پروتئین هیبرید کلسی‌تونین متشکل از ۱۶ اسیدآمینه سر کربوکسی sCT و ۱۶ اسیدآمینه سر آمین hCT توان فارماکولوژیکی معادل sCT دارد، ولی فاقد مشکلات گوارشی و ایمنولوژیک انسانی است [۱۷].

هدف از این تحقیق ایجاد موش‌های ترانس‌ژنیکی بود که واجد ترانس‌ژن بیان‌کننده کلسی‌تونین هیبرید انسان- ماهی آزاد در غدد شیری موش باشند.

مواد و روش‌ها

سازه ژنی. ۳ میلی‌لیتر خون تازه از ورید گردنی یک گوسفند نژاد مغانی که از هم‌خون‌ترین نژادهای گوسفندی در ایران است گرفته شد. DNA ژنومی گوسفند با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (پرومگا، آمریکا) تخلیص شد، تا DNA با وزن ملکولی بالا به‌دست آید، که قابل استفاده برای جداسازی ژن oBLG و نواحی کناری آن به کمک PCR باشد.



شکل ۱. سازه ژنی ۱۰/۹ کیلوبازی نهایی که در زیگوت‌ها تزریق شد متشکل از کل ژن oBLG است، که سازه ژنی کلسی‌تونین در چارچوب ترجمه پنجمین اگزون آن وارد شده است. جایگاه آنزیم‌های برشی به کار رفته برای خطی کردن ترانس‌ژن و ساترن‌بلات هم نشان داده شده است.

اگزون پنجم ژن oBLG، یعنی درست پس از کدون ۱۴۹ به عنوان محل واردسازی cDNA کلسی‌تونین هیبرید انتخاب شد (شکل ۱). بر این اساس، دو جفت پرایمر PCR طراحی شدند، تا برای تکثیر oBLG به کمک کیت Expand long template PCR (روشه، آلمان) مورد استفاده قرار گیرند: جفت b1f-b3r و جفت b4f-b4r (جدول ۱). جفت پرایمر اول برای تکثیر قطعه ۸/۰ کیلوبازی سمت ۵′ (قطعه b13) مورد استفاده قرار گرفت که شامل ۴/۲ کیلوباز از بالادست ژن به علاوه ۳/۸ کیلوباز از واحد، رونویسی می‌شد و جفت پرایمر دوم، ۲/۷ کیلوباز سمت ۳′ (قطعه b44) را تکثیر می‌کرد که شامل ۰/۸ کیلوباز از باقی‌مانده واحد رونویسی به علاوه ۱/۹ کیلوباز از پایین‌دست ژن می‌شد. هر دو محصول PCR جداگانه به کمک کیت TOPO XL (اینویتروژن، آمریکا) کلون شدند تا به‌ترتیب ناقل‌های topo-b13 و topo-b44

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

به‌دست آیند. صحت ساختاری کلون‌های حاصل به کمک تعیین توالی DNA مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

cDNA کلسی‌تونین طوری طراحی شد، که ۱۶ اسیدآمینه سر کربوکسی آن از sCT و ۱۶ اسیدآمینه سر آمین آن از hCT باشد. به‌علاوه یک گوشواره هیستیدین و جایگاه‌های مناسب برای آنزیم‌های برشی DNA و پپتیدازها برای آن در نظر گرفته شد. بر این اساس، دو الیگونوکلئوتید CTf (به طول ۹۷ باز) و CTr (به طول ۸۸ باز) که ۲۰ باز سر ۳َ آن‌ها مکمل هم بودند به صورت شیمیایی ساخته شدند. آن‌ها سپس طی شرایطی شبیه به PCR با هم مجاور شدند تا روی هم قرار گیرند و به کمک مخلوط آنزیمی DNA پلیمراز Taq-Tgo و dNTP یک‌دیگر را تکمیل سازند و یک قطعه ۱۶۵ جفت بازی کلسی‌تونین هیبرید را بسازند (جدول ۱). آن‌گاه سازه کامل و ۱۶۵ جفت بازی کلسی‌تونین به کمک کیت TOPO XL کلون شد (topo-CT) و صحت ساختاری آن با کمک تعیین توالی DNA به اثبات رسید.

جدول ۱. پرایمرهای مختلف به‌کار رفته برای ساخت سازه ژنی

نام	ارجاع به بانک ژن	توالی
b1f	X68105: 9-38	GCAGGTCCGCGGATCTCTGTGTCTGTTTTC
b3r	X12817: 4641-4613	GGTTTGATATCAAGCCGGATGTGCATGGG
b4f	X12817: 4608-4636	CCCTATCGATGCACATCCGGCTTGCCTTC
b4r	X12817: 7343-7315	GAAACTCGAGAGAAGCCTGCGCACCGAAC
CTf	صناعی؛ هیبرید	GATATCATCGAGGGCAGGCACCACCATCACCACCATGTCGACGACGAC GATAAGTGCGGCAACCTGTCTACCTGTATGCTCGGCACATATACTCAGA
CTr	صناعی؛ هیبرید	ATCGATTCAGCCCGGTGTGCCAGCGCCCACGTCGGTTCTAGGAT AGGTCTGCAGCTTGTGAGGAGTCTGAGTATATGTGCCGAGCATA

قطعه b44، به کمک هضم دوگانه با آنزیم‌های NotI و ClaI از ناقل topo آزاد شد و در ناقل topo-CT که قبلاً با NotI-ClaI خطی شده بود ساب‌کلون گردید، تا topo-CT-b44 به دست آید. آن‌گاه قطعه CT-b44 با هضم دوگانه به‌وسیله XhoI-EcoRV از ناقل خود آزاد شد و در ناقل topo-b13 که قبلاً به‌وسیله XhoI-EcoRV خطی شده بود ساب‌کلون گردید تا topo-b13-CT-b44 به دست آید. ناقل نهایی اخیر که b11ctv نامیده شد، حاوی کل توالی ژنی مورد نظر بود. کلیه محل‌های اتصال ژنی به کمک تعیین توالی DNA مورد بررسی قرار گرفتند و توالی آن‌ها با توالی‌های مندرج در بانک ژنی (جدول ۱) به تأیید رسید. سپس ناقل b11ctv به کمک سانتریفوژ با شیب سزیم کلراید تخلیص شد تا از هر گونه پلاسمید شکسته و آلاینده‌های اسید نوکلئیکی پاک‌سازی شود. ناقل خالص شده به‌وسیله SacII-XhoI هضم دوگانه شد تا قطعه خطی ۱۰/۹ کیلوبازی b11ct به دست آید. این سازه خطی با استفاده از الکتروفورز روی ژل بسیار خالص آگارز ۱٪ و کیت استخراج از ژل (کیاژن، آلمان)، مورد تخلیص قرار گرفت. قطعه خالص شده به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از یک غشای ۰/۰۲۵ میکرونی در برابر آب دو بار تقطیر شده دیالیز گردید؛ با استفاده از غشای ۰/۲۲ میکرونی فیلتر شد و تا غلظت 5ng/µl در بافر میکروانجکشن (تریس کلراید 10mM، 0.1mM EDTA، pH معادل ۷/۵) رقیق گردید تا آماده تزریق شود.

ایجاد موش‌های ترانس‌ژنیک. نسل اول (F1) موش‌های حاصل از جفت‌گیری دو موش B6 و DBA/2 با هم آمیزش داده شدند تا اولاً تخمک‌های تازه بارور شده لازم برای میکروانجکشن (Microinjection) به‌دست آیند و ثانیاً موش‌های ماده کرایه‌ای (Foster mice) لازم برای انتقال جنین حاصل گردند. در این جفت‌گیری‌ها برای حصول تخمک‌های تازه بارور شده (زیگوت) از موش‌های نر سالم و برای به‌دست آوردن موش‌های ماده کرایه‌ای از موش‌های نر وازکتومی شده استفاده شد. هر روز صبح، موشهای ماده‌ای که نشان از جفت‌گیری در شب قبل داشتند (متمایز با توپی واژینال، Vaginal plug) کشته می‌شدند تا تخمک‌های تازه بارور شده آن‌ها در خارج از بدنشان از لوله رحمی آزاد شوند. این سلول‌ها در محیط M2 حاوی هیالورونیداز بیضه گوسفند

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

قرار می‌گرفتند تا از سلول‌های پیرامونی خود کاملاً آزاد شوند و سپس ۳ بار در محیط واسط M2 شسته می‌شدند؛ آن‌گاه در محیط M16 و در دمای 37ºC و CO_2 با غلظت ۵٪ قرار داده می‌شدند تا آماده تزریق گردند.

برای انجام میکرواینجکشن، زیگوت‌ها با کمک پیپت دهانی از محیط M16 به محیط M2 انتقال داده شدند و با یک روغن معدنی بی اثر پوشانده شدند. لام حاصل روی میکروسکوپ اینورت مجهز به میکرومانیپولاتور گذاشته شد و سپس در حالی که زیگوت به وسیله پیپت نگه‌دارنده واقع در سمت چپ میدان دید میکروسکوپ ثابت نگه داشته شده بود، محلول سازه ژنی به‌وسیله پیپت انجکتور در پرونوکلئوس نر زیگوت که متمایزتر است تزریق شد، به نحوی که قطر آن حدوداً ۲ برابر شود. آن‌گاه پس از گزینش ماده موش‌های کرایه‌ای (جفت‌گیری کرده با موش‌های نر وازکتومی شده) و بی‌هوش ساختن آن‌ها، ۱۵ تا ۲۰ زیگوت با عمل جراحی میکروسکوپی به لوله رحمی هرکدام از موش‌ها انتقال داده شد. بدین ترتیب کل زیگوت‌هایی که تحت میکرواینجکشن قرار گرفته بودند به ۷ ماده موش کرایه‌ای که آبستنی کاذب داشتند انتقال داده شدند. موش‌های پذیرنده در شرایط کنترل شده از نظر نور، دما و رطوبت قرار گرفتند تا بچه‌هایشان را پس از ۱۹ تا ۲۰ روز به دنیا آورند.

بچه موش‌های به دنیا آمده به روش‌هایی که ذکر خواهند شد مورد بررسی قرار گرفتند تا بانی‌های ترانس‌ژنیک (Transgenic founders) مشخص شوند. این بانی‌ها پس از رسیدن به سن بلوغ با والدین بومی خود آمیزش داده شدند تا موش‌های ترانس‌ژنیک نسل اول (F1) به دست آیند. موش‌های ترانس‌ژنیک نسل اول هم پس از بلوغ با والدین بومی خویش آمیزش داده شدند تا موش‌های ترانس‌ژنیک نسل دوم (F2) از آن‌ها پدید آیند.

ارزیابی ترانس‌ژنز.

PCR. دو تا سه هفته پس از تولد بچه موش‌ها از مادران کرایه‌ای، پس از تعیین جنسیت و شماره‌گذاری آن‌ها به کمک بریدن انگشتان دست و پا، یک بیوپسی ۱ سانتی‌متری از دم آن‌ها به عمل آمد. سپس DNA ژنومی نمونه دمی به روش زیر تخلیص شد: ابتدا نمونه به صورت شبانه در ۶۰۰ µl محلول TNES-PrK (تریس ۵۰ mM، کلرید سدیم ۰/۴ M، EDTA ۰/۱ M، SDS ۰/۵%، پروتئیناز K ۰/۶ mg/ml) در دمای ۵۵ºC مجاور شد؛ سپس ۲۰۰ µl کلرید سدیم 5M به آن افزوده شد و پس از سانتریفوژ ۱۵ دقیقه‌ای با شتاب ۱۴۰۰۰ g، به مایع رویی آن در لوله‌ای دیگر معادل ۱ حجم اتانول خالص افزوده شد و مجدداً مورد سانتریفوژ قرار گرفت؛ رسوب حاصل نیز با معادل ۱ حجم اتانول ۷۰٪ شستشو و سانتریفوژ شد و رسوب نهایی در ۵۰۰ µl محلول TE حل گردید. DNAهای ژنومی حاصل به کمک جفت پرایمر 496f-768r تحت تعیین ژنوتیپ با PCR قرار گرفتند. جفت پرایمر مزبور (جدول ۱) پس از ۳۵ چرخه دناتوراسیون در ۹۴ºC، سرد شدن در ۵۹ºC و طویل شدن در ۷۲ºC، قطعه‌ای ۴۸۶ جفت بازی متناظر با بازهای ۷۹۸۰ تا ۸۴۶۵ ترانس‌ژن را تکثیر می‌کند.

اسلات بلات DNA. ۲-۱ µg از نمونه DNA (که برای PCR هم از آن استفاده شده بود) با اسلات بلات مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور با استفاده از پروتوکل‌های استاندارد [۱۳]، ابتدا DNA ژنومی به غشای نایلونی انتقال داده شد و تثبیت گردید و سپس از قطعه نشان‌دار (رادیواکتیو) ۱۶۵ جفت بازی کلسی‌تونین که با PCR تهیه شده بود و به بازهای ۸۰۲۰ تا ۸۱۸۴ ترانس‌ژن می‌چسبید، به عنوان کاوش‌گر استفاده شد.

ساترن بلات. DNA با وزن ملکولی بالا به کمک پروتوکل استاندارد [۱۴] برای آنالیز ساترن بلات تخلیص شد. ۱۲-۱۰ µg از هر نمونه به صورت شبانه به کمک آنزیم BamHI (۲۰۰ U) هضم شد و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸٪، به غشای نایلونی انتقال داده شد تا به‌وسیله ۲ قطعه نشان‌دار b11ct، به طول ۲/۵ و ۲/۲ کیلوباز مورد کاوش قرار گیرد. این دو قطعه به ترتیب متناظر با بازهای

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

۲۴۹۳-۱ و ۹۱۲۱-۶۹۳۰ ترانس‌ژن هستند. در نهایت رادیواکتیویته روی غشا به کمک فیلم فسفوایمیجر ردیابی و شناساسی شد.

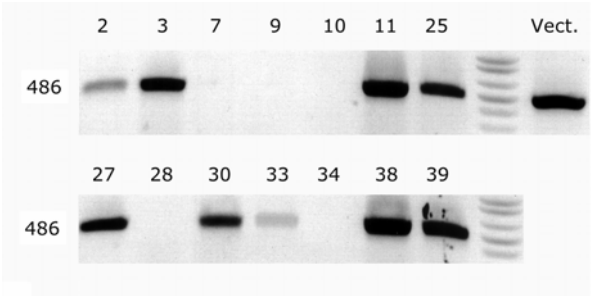
نتایج

سازه ژنی. سازه ژنی ۱۰/۹ کیلوبازی نهایی که در زیگوت‌ها تزریق شده بود، یعنی b11ct متشکل از سه قطعه اصلی بود (شکل ۱): ۱) قطعه‌ای ۸/۰ کیلوبازی شامل پروموتر و توالی‌های تنظیمی و بخش پروگزیمال واحد رونویسی oBLG؛ ۲) قطعه ۱۶۵بازی کلسی‌تونین و ۳) قطعه دیستال ۲/۷ کیلوبازی oBLG مربوط به بقیه واحد رونویسی و توالی‌های پایین‌دست. بدین ترتیب توالی کلسی‌تونین به صورت ترکیبی (Fusion protein) با پروتئین oBLG بیان می‌شود. این توالی علاوه بر دارا بودن cDNA هیبرید کلسی‌تونین انسان و ماهی آزاد، یک گوشواره هیستیدینی و جایگاه‌های آنزیمی (DNA و پروتئین) مناسب را نیز کد می‌کند. قطعه کلسی‌تونین حاوی یک کدون پایان نیز هست و لذا قسمتی از واحد رونویسی oBLG که پس از قطعه کلسی‌تونین قرار دارد رونویسی می‌شود، ولی ترجمه نمی‌گردد.

تولید موش‌های ترانس‌ژنیک. ۱۸ موش ماده که جفت‌گیری کرده بودند کشته شدند که از هرکدام از آن‌ها ۱۰ تا ۱۲ زیگوت به دست آمد؛ یعنی جمعاً حدود ۲۰۰ زیگوت. ۱۳۰ زیگوت ۳ ساعت پس از میکرواینجکشن در محیط M16 زنده ماندند که در گروه‌های ۱۵ تا ۲۰تایی به موش‌های ماده کرایه‌ای انتقال داده شدند. از مجموع ۷ موش کرایه‌ای به‌کار گرفته شده، در نهایت ۴۵ بچه موش به‌دنیا آمدند که ۴۱ عدد از آن‌ها پس از هفته اول زنده ماندند.

تعیین ژنوتیپ موش‌ها. ۴۱ موشی که پس از هفته اول زنده مانده بودند ابتدا به وسیله PCR تعیین ژنوتیپ شدند که ۹ تا از آن‌ها، یعنی ۴ نر و ۵ ماده، مثبت بودند. قطعه‌ای که در PCR تکثیر می‌شد، قطعه‌ای کاملاً اختصاصی و منحصر به فرد از ترانس‌ژن به طول ۴۸۶ باز بود که هم oBLG و هم CT را در بر می‌گرفت (شکل ۲). ۹ موشی که PCR آن‌ها مثبت بود تحت بررسی بیش‌تر با اسلات بلات DNA قرار گرفتند که مثبت بودن ۴ تا از آن‌ها را تأیید کرد (شکل ۳، جدول ۲). ساترن بلات هم نشان داد که این ۴ موش، ۲ نر و ۲ ماده، حاوی ترانس‌ژن هستند و نتایج اسلات بلات را تأیید کرد (شکل ۳، جدول ۲).

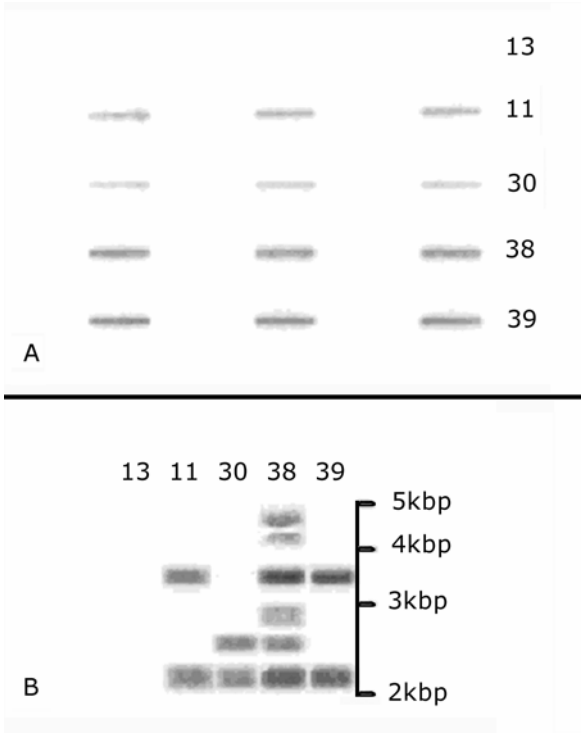
موش‌هایی که PCR آن‌ها مثبت بود و بالقوه بانی ترانس‌ژنیک محسوب می‌شدند، پس از بلوغ (در ۶ تا ۷ هفتگی) با والدین بومی خود آمیزش داده شدند تا فرزندان آن‌ها از نظر توارث ترانس‌ژن مورد بررسی قرار گیرند. ۶ موش (۳ نر و ۳ ماده)، حداقل یک بچه موش به دنیا آوردند که نتیجه تعیین ژنوتیپ آن‌ها با PCR مثبت بود (شکل ۲) و لذا بانی ترانس‌ژنیک (Transgenic founder; F0) تلقی شدند. بچه‌های این ۶ موش، نسل اول موش‌های ترانس‌ژنیک یا F1 را تشکیل دادند. از آن‌جا که معیار اصلی ترانس‌ژنیک بودن موش، آن است که ترانس‌ژن را به فرزندانش انتقال دهد، می‌توان نتیجه گرفت که ۶ رده مستقل موش ترانس‌ژنیک ایجاد شده است (شکل ۴، جدول ۲).



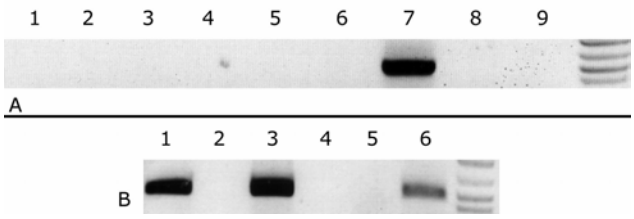
شکل ۲. تعیین ژنوتیپ موش‌های بانی با استفاده از PCR با جفت پرایمر 496f-768r که در موش‌های مثبت، محصولی به طول ۴۸۶ جفت باز می‌سازد. ۶ تا از ۹ موش مثبتی که از این طریق به دست آمدند ترانس‌ژن را به فرزندان خود انتقال دادند. کنترل مثبت در خط "Vect." نشان داده شده است.

حداقل یکی از فرزندان ترانس‌ژنیک نسل اول در هر خانواده از نظر انتقال ترانس‌ژن به نسل دوم مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه همه آن‌ها مثبت بود، یعنی همه فرزندان ترانس‌ژنیک نسل اول توانستند ترانس‌ژن را به نسل دوم انتقال دهند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۳. A. اسلات بلات DNA در موش‌های بانی ترانس‌ژنیک از نظر b11ct که ۴ تا از بانی‌های ترانس‌ژنیک را نشان می‌دهد. B. بررسی ساترن بلات بانی‌های ترانس‌ژنیک از نظر b11ct. در این‌جا نیز همان موش‌هایی مثبت بودند که در اسلات بلات مثبت شده بودند. باند ۲/۲ کیلوبازی در تمام بانی‌ها دیده می‌شود، ولی کاوش‌گر دیگر که بر ضد ۲/۵ کیلوباز سر ’5 ترانس‌ژن طراحی شده، باندهایی متفاوت می‌سازد؛ یک باند ۲/۵ کیلوبازی که معرف خود کاوش‌گر است، یک باند ۳/۴ کیلوبازی که نشان‌گر یک قطعه ۲/۵+۰/۹ کیلوبازی حاصل از به هم پیوستن دو ملکول پیاپی ترانس‌ژن است و باندهای غیراختصاصی در بانی ۳۸ که به احتمال زیاد ناشی از وجود بیش از یک محل ورود ترانس‌ژن در ژنوم میزبان است.



شکل ۴. تعیین ژنوتیپ نسل اول موش‌های ترانس‌ژنیک (F1) در خانواده‌های ۲ و ۱۱. بانی ۲ ترانس‌ژن را به تنها یکی از ۹ فرزند خود منتقل کرده است؛ این اتفاق که با توارث مندلی سازگار نیست به احتمال بسیار زیاد ناشی از موزاییسم در سلول‌های ژرمینال است. بانی ۱۱، ترانس‌ژن را به نیمی از فرزندانش انتقال داده که این پیش‌آمد با توارث مندلی سازگار است. تمامی بانی‌ها به جز بانی ۲ الگوی مشابهی را در انتقال ترانس‌ژن از خود نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این‌جا درباره چگونگی تولید موش‌های ترانس‌ژنیک بحث کردیم که واجد یک ترانس‌ژن بیان کننده کلسی‌تونین به صورت اختصاصی در شیر و تحت پروموتر گوسفندی بتالاکتوگلبولین (oBLG) هستند. برای این منظور از توالی ژنومی کامل oBLG استفاده شد تا از اثرات شبه افزاینده اینترون‌های آن بهره‌برداری شود و در ضمن خود پروتئین oBLG به عنوان پروتئین ترکیبی با کلسی‌تونین عمل کند، زیرا خود کلسی‌تونین به تنهایی کوچک است و ممکن است در محیط شیر پایدار نباشد. از این راهبرد تولید پروتئین ترکیبی می‌توان برای بیان پروتئین‌های بسیار فعال که نشت احتمالی آن‌ها از غدد شیری به گردش خون برای میزبان مضر است نیز استفاده کرد. با ترکیب کردن پروتئین مورد نظر با یک پروتئین دیگر می‌توان پروتئینی بزرگ‌تر و کم‌اثرتر تولید کرد که شانس نشت آن به گردش خون کم‌تر باشد یا در صورت نشت، اثرات عمومی کم‌تری از خود به جای گذارد.

سازه ژنی به کار رفته در این تحقیق در مقایسه با تنها تحقیق منتشر شده در زمینه تولید کلسی‌تونین در شیر حیوانات ترانس‌ژنیک [۷]، تفاوت‌های زیادی دارد. اولاً توالی کلسی‌تونین به کار رفته هیبریدی از کلسی‌تونین انسان و ماهی آزاد است، نه ماهی آزاد. ثانیاً از پروتئین ترکیبی بتالاکتوگلبولین گوسفندی استفاده شده است، نه آلفالاکتالبومین انسانی. ثالثاً عناصر الحاقی ترانس‌ژن از جمله گوشواره هیستیدین و جایگاه برشی فاکتور X خونی نیز به کار رفته است.

از آن‌جا که DNA تزریق شده در زیگوت ممکن است حین یا پس از فاز S چرخه سلولی وارد ژنوم شود، موش حاصل ممکن است از نظر ترانس‌ژن، موزاییک باشد. شدت موزاییسم بستگی به زمان دقیق ورود ترانس‌ژن از نظر تقسیمات زیگوتی دارد؛ مثلاً اگر ترانس‌ژن در مرحله دوسلولی وارد ژنوم شود، حداکثر ۵۰٪ سلول‌های حاصل، ترانس‌ژنیک هستند ولی اگر در مرحله ۴ سلولی وارد شود، بیش از ۲۵٪ سلول‌ها واجد ترانس‌ژن نخواهند بود. این امر تا حدودی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

می‌تواند باعث سردرگمی هنگام تعیین ژنوتیپ موش‌های حاصل شود، زیرا ممکن است درصد سلول‌های واجد ترانس‌ژن چنان کم باشد که ساترن بلات و اسلات بلات را منفی سازد، در حالی که این درصد برای مثبت شدن نتیجه تعیین ژنوتیپ با PCR که روشی بسیار حساس است کافی باشد. نظیر این اتفاق حداقل در مورد موش بانی شماره ۲ افتاد؛ به طوری که نتیجه PCR آن مثبت بود، ولی ساترن و اسلات بلات آن مثبت نشد.

جدول ۲. خلاصه نتایج ترانس‌ژنز

موش شماره (نر/ماده)	۲ (ن)	۳ (م)	۱۱ (م)	۲۵ (م)	۲۷ (م)	۳۰ (ن)	۳۳ (ن)	۳۸ (م)	۳۹ (م)
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اسلات بلات DNA	-	-	+	-	-	+	-	+	+
ساترن بلات	-	-	+	-	-	+	-	+	+
مثبت‌های نسل اول با PCR	1/9	7/12	6/12	0/8	0/8	7/12	0/11	4/8	3/10
نسل اول ترانس‌ژنیک	+	+	+	-	-	+	-	+	+

اگر موزاییسم جنین به گونه‌ای باشد که سلول‌های رده ژرمینال، فاقد ترانس‌ژن باشند، فرزندان آن موش ترانس‌ژن را به ارث نخواهند برد؛ در حالی که ممکن است سلول‌های پیکری (سوماتیک) همان موش، ترانس‌ژنیک باشند. اما با توجه به این که شرط اصلی برای ترانس‌ژنیک بودن یک موش آن است که بتواند ترانس‌ژن را به نسل بعدی خویش انتقال دهد، چنین موشی را نمی‌توان بانی ترانس‌ژنیک در نظر گرفت، حتی اگر تمامی آزمایش‌های تعیین ژنوتیپ آن (که بر روی بافت‌های پیکری انجام می‌شوند) از جمله PCR و ساترن و اسلات بلات مثبت باشند. بدین ترتیب موش‌های ۲۵، ۲۷ و ۳۳ با وجود آن که PCR مثبت داشتند، به علت آن که نتوانسته بودند ترانس‌ژن را به نسل بعدی خود منتقل کنند بانی ترانس‌ژنیک محسوب نمی‌شوند. موش بانی ۲ چنان موزاییک بود که تنها یکی از ۹ فرزند نسل اول آن ترانس‌ژنیک شدند.

عامل دیگری که بر تعیین ژنوتیپ تأثیر می‌گذارد، تعداد نسخ ترانس‌ژن است که در ژنوم میزبان وارد شده است. آن دسته از خانواده‌های ترانس‌ژنیک که تعداد نسخ کم‌تری از ترانس‌ژن داشته باشند باندهای ضعیف‌تری در بلات‌ها ایجاد می‌کنند. برای تعیین تعداد نسخ ترانس‌ژن می‌توان شدت باندهای بلات در نسل اول موش‌های ترانس‌ژنیک (F1) هر خانواده را با خانواده دیگر مقایسه کرد. موش‌های بانی هر خانواده را نمی‌توان با این روش با هم مقایسه کرد، زیرا آن‌ها ممکن است از نظر ترانس‌ژن موزاییک باشند.

مخلوط کاوش‌گرهای ۲/۲ و ۲/۵ کیلوبازی که برای ساترن بلات به‌کار رفت، الگویی به ظاهر ناهمگون ایجاد کرد که جز با دقت در اصول ورود تصادفی ترانس‌ژن در ژنوم میزبان قابل توجیه نیست. سازه ژنی خطی که در زیگوت تزریق می‌شود معمولاً پیش از ورود تصادفی در ژنوم به صورت زنجیره‌ای متشکل از بیش از یک ملکول درمی‌آید. درضمن این ترانس‌ژن تمایل دارد تا به صورت تصادفی تنها در یک نقطه از ژنوم وارد شود، نه در چند نقطه. در آزمایش ما، کاوش‌گر ۲/۲ کیلوبازی که به ناحیه‌ای داخلی از ترانس‌ژن می‌چسبد در ساترن بلات تمام خانواده‌های ترانس‌ژنیک، یک باند متناظر ۲/۲ کیلوبازی ایجاد کرد. اما کاوش‌گر ۲/۵ کیلوبازی کناری در خانواده‌های گوناگون، باندهایی متفاوت (یعنی یک باند ۲/۵ کیلوبازی در خانواده‌های ۳۰ و ۳۸ و یک باند ۳/۴ کیلوبازی در خانواده‌های ۱۱، ۳۸ و ۳۹) پدید آورد. علت این امر آن است که ترانس‌ژن پیش از ورود در ژنوم، به‌صورت زنجیره درمی‌آید و چون هیچ‌کدام از دو سر ترانس‌ژن تک ملکولی جایگاه برش BamHI را ندارد، قطعه ۰/۹ کیلوبازی BamHI سر ´۳ هر ملکول ترانس‌ژن به قطعه ۲/۵ کیلوبازی BamHI در سر ´۵ ملکول بعدی زنجیره اضافه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

می‌شود و در ساترن بلات به صورت یک باند ۳/۴ کیلوبازی دیده می‌شود. این اتفاق صرفاً در خانواده‌هایی می‌افتد که بیش از یک نسخه از ترانس‌ژن دارند. چون ابتدای ترانس‌ژن فاقد جایگاه برشی BamHI است، طول ظاهری باند قطعه اول به این بستگی دارد که نزدیک‌ترین جایگاه BamHI واقع بر ژنوم میزبان با چه فاصله‌ای از آن قرار گرفته باشد.

در مجموع، ۶ خانواده موش ترانس‌ژنیک با موفقیت ایجاد شدند که هر کدام از آن‌ها ترانس‌ژن oBLG-CT را به صورت پایا و تابع قواعد مندلی به نسل‌های اول و دوم خود انتقال دادند.

منابع

[1] Bittar EE, Bittar N. Principles of medical biology: molecular and cellular endocrinology. Jai Press Inc., 1997, 10B, 610-6.

[2] Carver AS, Dalrymple MA, Wright G, Cottom DS, Reeves DB, Gibson YH, et al. Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. Biotechnology (N Y), 1993; 11(11):1263-70.

[3] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. Biochem J, 1996; 318 (Pt 1):1-14.

[4] Hyttinen JM, Korhonen VP, Hiltunen MO, Myohanen S, Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. J Biotechnol, 1998; 61(3):191-8.

[5] John DC, Watson R, Kind AJ, Scott AR, Kadler KE, Bulleid NJ. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. Nat Biotechnol, 1999; 17(4):385-9.

[6] Kolb AF, Pewe L, Webster J, Perlman S, Whitelaw CB, Siddell SG. Virus-neutralizing monoclonal antibody expressed in milk of transgenic mice provides full protection against virus-induced encephalitis. J Virol, 2001; 75(6):2803-9.

[7] Korhonen VP, Tolvanen M, Hyttinen JM, Uusi-Oukari M, Sinervirta R, Alhonen L, et al. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. Eur J Biochem, 1997; 245(2): 482-9.

[8] Maier R. Analogues of human calcitonin. Calcif Tissue Res, 1976; 21 Suppl:317-20.

[9] McKee C, Gibson A, Dalrymple M, Emslie L, Garner I, Cottingham I. Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. Nat Biotechnol, 1998; 16(7):647-51.

[10] Mercier JC, Vilotte JL. Structure and function of milk protein gene. J Dairy Sci, 1993; 76(10):3079-98.

[11] Perez MD, Calvo M. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. J Dairy Sci, 1995; 78(5):978-88.

[12] Prunkard D, Cottingham I, Garner I, Bruce S, Dalrymple M, Lasser G, et al. High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice. Nat Biotechnol, 1996; 14(7):867-71.

[13] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed. CSHL Press, 2001, 7.46-7.50, 6.34-6.49.

[14] Webster J, Donofrio G, Wallace R, Clark AJ, Whitelaw CB. Intronic sequences modulate the sensitivity of beta-lactoglobulin transgenes to position effects. Gene, 1997; 193(2):239-43.

[15] Whitelaw CB, Grolli S, Accornero P, Donofrio G, Farini E, Webster J. Matrix attachment region regulates basal beta-lactoglobulin transgene expression. Gene, 2000; 244(1-2):73-80.

[16] Whitelaw CB, Harris S, McClenaghan M, Simons JP, Clark AJ. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. Biochem J, 1992; 286 (Pt 1):31-9.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]